植 物 分 类 学 报 36 (1):87～96 (1998)
Acta Phytotaxonomica Sinica

原位杂交技术在稻属研究中的应用*

[1]张寿洲 [2]卢宝荣 [1]洪德元
[1](中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室 北京 100093)
[2](国际水稻研究所种质资源中心 P. O. Box 933 1099 马尼拉 菲律宾)

IN SITU HYBRIDIZATION AND ITS APPLICATION IN STUDIES ON *ORYZA*

[1]ZHANG Shou-Zhou [2] LU Bao-Rong [1] HONG De-Yuan
[1](*Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093)
[2](*Genetic Resources Center, International Rice Research Institute*, Manila 1099, P.O. Box 933, Philippines)

Abstract *In situ* hybridization is one of the most promising methods to identify certain genetic markers on individual chromosomes. To trace the structural evolution course in the genus *Oryza*, some genes and other detectable molecular markers have been localized at specific chromosomes through this technique. However, reports, especially on the wild species, are still limited. Its applications, e.g., to discriminating and identifying the relationships among different genomes, are still open to be explored.

Key words *In situ* hybridization; *Oryza* L.

摘要 在文献综述的基础上,对原位杂交技术在稻属的应用进行了介绍,主要包括 3 个方面:(1)特定 DNA 序列的定位;(2)构建染色体的物理图谱及其与遗传图谱之间的关系;(3)稻属基因组间关系的研究。

关键词 原位杂交;稻属

原位杂交技术(*In situ* hybridization,简称 ISH)的应用是由 Gall 和 Pardue(1969)利用标记的 rDNA 探针与非洲爪蟾细胞核杂交首次获得成功,该方法是由滤膜杂交改进为直接将探针杂交于细胞核或染色体的特定位置。此方法在动物及人类研究中发展很快,但在植物中因细胞壁对核苷酸起阻碍作用,使其应用受到一定限制。自植物细胞原生质体制备技术报道以后,ISH 技术在植物研究中愈来愈广。目前原位杂交技术在植物研究中的应用主要包括以下几个方面:(1)特定 DNA 序列在染色体上的定位(包括单拷贝基因,中度重复序列和高度重复序列);(2)基因表达研究;(3)多倍体的起源;(4)基因组间关系;(5)杂种及染色体导入片段的鉴定。

稻 *Oryza sativa* L 是世界三大粮食作物之一,因而对其各方面的研究甚多。稻属染色体的研究尽管已有近 90 年历史,但由于客观条件限制,鉴定稻属的每一条染色体仍很困难,主要是稻中期染色体小而且形态上很相似,染色体标本制作比较困难,而染色体带型又因稻属染色体在有丝分裂中期以前的不同染色体片段固缩程度不一致而不稳定。ISH 技术在稻属的应用也由于上述原因而受到一定限制。Kurata(1986)建议在稻属中利

* 中国科学院重大(B)项目;中国科学院院长基金和中国科学院生物区系特别费支持项目。
1997-01-30 收稿,1997-07-28 收修改稿。

用ISH进行染色体研究，使得每一条染色体各自有特定的标记(marker)，便于各条染色体的识别，但由于可利用的染色体特异标记有限，这项工作迄今还属刚起步。目前原位杂交技术在稻属的应用集中在以下3方面：(1)特定DNA序列的定位；(2)构建染色体物理图谱以及研究物理图谱和遗传图谱之间的关系；(3)用ISH技术研究稻属基因组间关系。

1 特定DNA序列定位

稻属中已经定位的序列包括高度重复序列(如rDNA，端粒序列)、中度重复序列和其它一些低拷贝和单拷贝基因。

1.1 高度重复序列

1.1.1 18s/5.8s/26s rDNA

18s/5.8s/26s rDNA在基因组中为串接重复序列，在不同物种中其拷贝数为500～40 000，与核仁的形成有关。用放射性同位素或非放射性的化学半抗原标记的该序列与前中期染色体进行ISH杂交，经过检测，可以将该序列定位在稻属染色体的特定位置。截止目前，18s/5.8s/26s rDNA在两种栽培稻染色体上的准确位置以及在其它14种野生稻中位点的数目已有报道(表1)。这些报道表明rDNA之位点数在栽培稻不同品种和不同种野生稻中的数目有一定的变异(1～5)。在稻*O. sativa*的不同亚种以及其最近缘类群多年生野生稻*O. rufipogon* Griff.中位点数目变化有一定规律。栽培于温带的粳稻具一个rDNA位点，位于热带和亚热带的籼稻和爪哇稻具2个位点，爪哇稻又称热带粳稻，其形态及其它分子生物学研究(如核DNA的RFLP分析)结果均表明它与粳稻关系较近，而其rDNA位点数却与籼稻相同，这可能是由于籼稻、爪哇稻生长在相似环境的缘故(Fukui *et al*., 1994)。与亚洲栽培稻近缘的野生稻包括普通野生稻*O. rufipogon*和一年生野生稻*O. nivara*，后者具2个rDNA位点，而前者则有1和2两种类型，这种位点数目变异的意义目前还不甚清楚。

在已报道的其它14种野生稻植物中，A基因组除与*O. sativa*近缘的类群有1～2个rDNA位点变化外，其它种的位点数目皆为1。*O. punctata* Kotschy ex Steud.具BB和BBCC二种基因组类型，BB类型位点数目为1，BBCC的*O. punctata*与同具BBCC基因组类型的*O. minuta* J. S. Presl. ex C. B. Presl的位点数目一致，均具有3个位点(Fukui (1994)报道的*O. punctata* (NIG W1582 BB)具3个位点，但最近他们怀疑可能有误(私人通信))。CC基因组已定位的包括两个种*O. officinalis* Wall. ex Watt和*O. eichingeri* A. Peter(另一种*O. rhizomatis* Vaughan rDNA位点数未见报道)，前者具3个位点，而后者仅2个，这一结果以及*O. sativa*的不同亚种之间和其近缘类群*O. rufipogon*和*O. nivara*的位点变异说明同一基因组的45s rDNA位点数目也可能不同。含E基因组和F基因组的野生稻各具一个种，其rDNA位点数分别为2和1，含CCDD基因组的3个四倍体种中，rDNA位点数在*O. latifolia* Desv.中为5，而在另两个种中均为3。根据Wang等(1995)通过对稻属核基因组的RFLP以及对其系统发育研究结果的推论表明，E基因组可能与D基因组有关(携带D基因组的二倍体还没有发现)，E的祖先类群可能在CCDD物种形成过程中起重要作用，含CC基因组的*O. officinalis*具3个rDNA位点，而E基因组具2个位点，如果在物种形成过程中两基因组中携带有rDNA位

点的臂或片段未参加染色体结构重排,同时位点的表达不受其它基因的抑制,则具 CCDD 的物种的 rDNA 位点数应该为 5。根据 Zhang *et al*.(1996)对 *O. alta* Swallen 和 *O. grandiglumis* (Doell) Prod.检测结果,该二种仅具 3 个位点,这一点还有待进一步研究。根据杂交信号的强度,具 2 个或 2 个以上杂交信号的物种,其信号明显有强弱之分,这很可能与该基因在不同位点上的拷贝数的多少有关。

含有 18s/5.8s/26s rDNA 的染色体部分即为核仁组织区(nucleolar organizer regions,简称 NORs)。如果 rDNA 在细胞分裂间期表达,携带该基因的染色体即在 NORs 处形成核仁,具 NORs 的染色体即随体染色体。稻 *O. sativa* 和非洲栽培稻 *O. glaberima* 的随体染色体数目与 18s/5.8s/26s rDNA 基因位点数目是一致的,说明其具有的 rDNA 均能表达;而在四倍体的 CCDD 物种中,尽管有 3～5 个 rDNA 位点,但核型分析表明却仅具二对随体染色体(张寿洲,未发表资料),说明有其它位点可能没有表达。在稻属中用细胞学的方法对随体染色体的研究已有一些报道,但这些报道局限于 *O. sativa* 的 3 个不同亚种,而对野生稻则很少有详细的研究,这与这些类群的染色体较小不无关系。Fukui (1987)首次用 ISH 法在稻 *O. sativa* 中研究 rDNA 的位点数和具体位置,现在这两种栽培稻的 rDNA 位点数和位置已经查明,其余 13 种皆仅知其位点数,而精确的位置还有待进一步研究。

1.1.2　5s rDNA

5s rDNA 基因在染色体上的位置不象 45s rDNA 那样有明显的形态学标记。Song & Gustafson(1993) 在籼稻中将 5s rDNA 定位于第 9 号染色体的末端,并认为这一结果与其三体剂量分析的结果相一致。而 McCouch(1988) 却将 5s rDNA 定位于第 11 号染色体的图的末端,而 45s rDNA 基因复合体定位在第 9 号染色体的图的末端。Tansley *et al*. (1992)认为 5s rDNA 与一个端粒探针连锁,而 Wu & Tansley(1993) 则将端粒探针定位于染色体 11 的端部,与 5s rDNA 位于第 11 号染色体的结果相吻合。

Kamisugi *et al*.(1994)和 Ohmido & Fukui(1995)发现粳稻 5s rDNA 位于第 11 号染色体的短臂近着丝粒处;而 Chung 等(1993)对 IR36 的研究结论是除上述位点外,第 7 和第 9 对染色体亦具 5s rDNA 位点。这种位点数目的差异可能与不同的栽培品种有关 。Ohmido & Fukui(1995)亦将 *O. glaberrima* Steud. 5s rDNA 定位在第 11 号染色体短臂近着丝粒处。

McIntyre *et al*.(1992)通过对稻属 9 个种 5s rDNA 测序和膜杂交结果,发现稻属 5s rDNA 具基因组特异性。这主要是由于其基因间隔区的序列变异的结果。利用 5s rDNA 在稻属这种特点,研究同一基因组的不同植物以及不同基因组间的类群中该基因的比较定位工作,有可能象在山羊草属(小麦族复合体)植物那样揭示一些遗传变异的机制(Badaeva *et al*.,1996),目前 5s rDNA 在野生稻中定位尚未见报道 。

1.2　中度重复序列

Wu *et al*.(1991) 首先应用 ISH 技术在稻属植物中对中度重复序列进行染色体定位。3 个从基因组文库中筛选出的重复序列(长度分别为 Os48:355 bp, OsG3:498 bp, OsG5:756 bp)分别用放射性同位素进行标记并作探针,与 *O. sativa* 有丝分裂前中期染色体进行杂交,其结果是 3 个序列分别被定位于第 7 号染色体长臂末端、所有 12 对染色

表1 18s/5.8s/26s rDNA 基因在稻属16种染色体的定位及位点数目

Table 1 The number and location of rDNA(18S/5.8S/26S) genes in 16 *Oryza* species detected by ISH

种名 Species		凭证标本 Voucher Specimen	rDNA基因在染色体上的位置 Chromosome location of rDNA genes	rDNA基因在单倍基因组的位点数目 No. of rDNA loci in haploid genome(x)	文献引证 literature
稻 *O. sativa*	粳稻 *Japonica*	To 65	8		Chung *et al*., 1993
		CN242	8		
			10		Fukui *et al*., 1987
		Nipponbare	11		Iijima *et al*., 1991
		Nipponbare		1	Fukui *et al*., 1994
		Aikoku		1	
		Tsushimankamai		1	
		Tarizaohsen		1	
		Kouketsumochii		2	
		Ch 78		1	
		Ch 79		1	
	籼稻 *Indica*	IR36	8, 10		Chung *et al*., 1993
		IR36	9, 10		Islam-Faridi *et al*., 1990
		Chinsurah Boro II		2	Fukui *et al*., 1994
		Kasalath		2	
		IR36		2	
	爪哇稻 *Javanica*	Ketan Nanga		2	Fukui *et al*., 1994
		Inakupa		2	
非洲栽培稻 *O. glaberrima*		W 025	9		Ohmido & Fukui, 1995
一年生普通野稻 *O. nivara*		India		2	Fukui *et al*., 1994
多年生普通野稻 *O. rufipogon*		India		2	Fukui *et al*., 1994
		China		1	
		China		1	Zhang *et al*., 1997
展颖野稻 *O. glumaepatula*		NIG W 1192		1	Fukui *et al*., 1994
		IRGC 103810		1	Zhang *et al*., 1997
矮舌野稻 *O. barthii*		IRGC 104140		1	Zhang *et al*., 1997
南方野稻 *O. meridionalis*		IRGC 103317		1	Zhang *et al*., 1997
长雄蕊野稻 *O. longistamina*		IRGC 104075		1	Zhang *et al*., 1997
斑点野稻 *O. punctata*		NIG W 1582B		3	Fukui *et al*., 1994
		IRGC 104073 B		1	Zhang *et al*., 1997
		IRGC 105137 BC		3	
药用野稻 *O. officinalis*		NIG W 0002		3	Fukui *et al*., 1994
		IRGC 105112		3	Zhang *et al*., 1997
		PB 940130		3	
小粒野稻 *O. minuta*		IRGC 103874		3	Zhang *et al*., 1997

Table 1.(Cont.)

种名 Species	凭证标本 Voucher Specimen	基因在染色体上的位置 Chromosome location of rDNA genes	rDNA 基因在单倍基因组的位点数目 No. of rDNA loci in haploid genome(x)	文献引证 literature
紧穗野稻 *O. eichingeri*	NIG W 1521		3	Fukui *et al*., 1994
短药野稻 *O. brachyantha*	NIG W 1401		2	Fukui *et al*., 1994
澳洲野稻 *O. australiensis*	NIG W 1538		2	Fukui *et al*., 1994
	IRGC 105272		2	Zhang *et al*., 1997
阔叶野稻 *O. latifolia*	NIG W 0019		5	Fukui *et al*., 1994
	IRGC 103808		5	Zhang *et al*., 1997
大颖野稻 *O. grandiglumis*	IRGC 105669		3	Zhang *et al*., 1997
高杆野稻 *O. alta*	IRGC 100161		3	Zhang *et al*., 1997

体短臂异染色质区和所有 12 对染色体的着丝粒两侧。

Mawal *et al*.(1995)在 *O. sativa* 基因组文库中筛选出 2 个重复序列(Ⅱ-13-1 和Ⅱ-17-1),利用 ISH 技术将这两个重复序列分别定位,结果是Ⅱ-13-1 被定位在第 1、3、8、9、10 和 12 号染色体上,常染色质区和异染色质区均有杂交信号,两者比例为 1:17,而且发现异染色质较少的第 1、2 和 3 号大染色体杂交信号明显少于异染色质较少的第 8、9、10、12 号小染色体,Ⅱ-17-1 被定位于第 1、2、3、7、9、10、11、12 等染色体,而且杂交信号比Ⅱ-13-1 多 2 倍以上。

Ohmido (1995)通过荧光原位杂交(Fluorescent *in situ* hybridization,简称 FISH)从 *O. sativa* 的一个品种中筛选出的重复序列 TrsA (360 bp)在两个栽培稻种中进行定位,定位的结果表明转座子在基因组中的扩增可能受到位点的限制,在粳稻中该序列被定位于第 6、第 12 号染色体长臂近端部,在籼稻中定位于第 5、7、8、9、10 和 11 号等染色体长臂的近端部,在 *O. glaberrima* 中则定位于第 5、6 和 7 号染色体长臂近端部。转座可能在不同位点随机发生,而结果表明该序列只存在于染色体长臂的近端,表明转座以后的扩增与位点有关,当该序列转座于染色体的长臂近端部区即扩增,而于其它位点则不能扩增,其机理目前还不清楚。

Wang *et al*.(1995)首次报道利用 ISH 技术确定稻 *O. sativa* 第 5 号染色体的特异性重复序列,该重复序列(G 1043)的拷贝数在 900 个以上,利用该序列与前中期分裂相进行原位杂交结果,将该探针定位在第 5 号染色体的长臂近着丝粒处,利用该重复序列作探针进行酵母人工染色体(YAC)文库的筛选,只有一个阳性的 YAC 有杂交信号支持这一结论。

1.3 低拷贝数和单拷贝基因之定位

Suzuki *et al*.(1991)利用放射性标记的谷蛋白基因 glutelin 作为探针与稻 *O. sativa* L.前中期和早中期染色体杂交,杂交信号集中在第 2 号染色体的短臂,在第 1 号染色体的短臂也有部分银粒沉积,故提出谷蛋白基因 Glutelin 可作为第 2 号染色体的特征分子

标记,但因该基因家族中有一部分存在于第 1 号染色体,而特征分子标记只能存在于某一连锁群,只有这样,这些特征标记才能正确地用于染色体的鉴定。现在的工作离 Kurata (1992)提出的在稻属中建立一套染色体特异性分子标记的目标相距甚远。

Wu *et al*.(1986)利用放射性同位素标记 rbsc 基因为探针与籼稻 IR36 前中期染色体进行原位杂交,在所有 12 对染色体中有 2～3 对染色体有银粒沉积, 大多数银粒集中在第 9 号染色体上(按第 2 次 IRRI 水稻染色体新的命名系统,原文为第 8 号染色体),在第 2 对和第 10 对染色体上也有银粒沉积。用该基因做探针进行膜杂交,得到 2～3 个杂交带,与原位杂交的结果是一致的。

2 构建染色体的物理图谱以及研究物理图谱和遗传图谱之间关系

原位杂交技术的改进已从最初的将重复序列在染色体或间期核的定位发展到用单拷贝序列和低拷贝序列构建染色体的物理图谱。栽培稻的染色体分子图谱最早报道于 1988 年 7 月, 目前定位于各连锁群的分子标记已达 1374 个。最初是 Gustafson & Dille (1992)在稻属利用原位杂交技术构建染色体的物理图谱,他们将 23 个 RFLP 标记分别定位于第 1～6、第 9～10 号等 8 个染色体,Song & Gustafson(1993) 将 14 个 RFLP 标记定位于稻的第 7～8、第 11～12 号等 4 个染色体,这样 12 个染色体均有以 ISH 技术建立的染色体物理图谱,将这一图谱与遗传学图谱相比较,可以确立各连锁群与各染色体的对应关系。McCouch 等(1988) 和 Tanksley 等(1992) 将 RG29 定位于第 7 号染色体的短臂,而原位杂交结果将其定位于第 8 号染色体,这两者明显有矛盾。Tanksley 等(1992) 根据其进一步研究,已将 RG29 移入第 8 号连锁群,RG98 在 McCouch 等(1988) 的图谱中被定位于第 12 号染色体,这一结论与原位杂交的结果相一致,而 Tanksley 等(1992) 却将其移至第 11 号连锁群之端部。造成这种不一致的原因,可能是由于 1988 和 1992 两个分子图谱的作图群体不同,也可能是由于染色体相互易位的结果,即 RG98 在 IR36 上位于第 12 号染色体 ,而在另一品种移至另一位置。同时利用 ISH 构建染色体的物理图谱有助于分析遗传图谱中的重组值和物理图谱中探针之间的物理距离之间的关系,这主要是因为多数分子图谱是依据相对远缘亲本之间杂交构建的作图群体建立的。但在禾本科植物中,这种“远缘”杂交可能减少减数分裂的配对数,导致错分裂和增加非整倍体变异的频率,这些因素会导致所计算的遗传距离出现一些误差,而原位杂交的标记点常覆盖将近百万个碱基对,故此,两者在图的距离上常有一定差异。利用减数分裂粗线期以及间期铺展的染色质纤维(EDF)进行原位杂交,可以获得高分辨的染色体物理图谱(Fransz *et al*., 1996),而这一技术在稻属目前还未见报道。

3 研究稻属基因组间关系

基因组类型的确立以及基因组间关系的研究最常规的方法是对种间杂种 F1 减数分裂染色体配对的分析,稻属各物种基因组的确立也正是利用了这一手段。然而,由于稻属染色体较小,各基因组间染色体核型相对一致,即各基因组染色体缺少特征性的标记(如 C 带和 C-G-带带型),这样在不同基因组的种间杂种后代分析中,就很难分清参与配对的染色体是属于同源配对还是异源配对,特别是对于配对构型比较复杂的种间杂种,准确的

分析就更加困难。基因组原位杂交(Genome *in situ* hybridization,简称 GISH)是建立在基因组完全同源的基础上的一种分子杂交技术。这一技术利用某个多倍体或某个杂种的一个亲本标记之总 DNA 做探针,而另一亲本的基因组 DNA 作封阻与该多倍体或杂种的细胞学制片上的染色体杂交,在杂交过程中标记的 DNA 优先与其完全同源的 DNA 序列杂交,根据杂交结果来推测异源多倍体的染色体组成或异源染色体片段的渗入状况,如果不同基因组间有大的结构变异,如易位,杂交的结果能清楚地显示其易位染色体的结合点。稻属染色体由于具有前述特点,加上细胞学制片相对比较困难,故目前 GISH 技术在稻属的应用的报道要比其他栽培作物少得多。在 1995 年第三届水稻细胞遗传学会议上,Shishido 等(1995) 报道了他们研究的结果,利用 CC 基因组(*O. officinalis*)的总 DNA 做探针,与美州四倍体种 *O. latifolia* 的染色体标本进行原位杂交,结果在 48 条染色体中,24 条染色体带较强的荧光信号,被认为是 CC 基因组。其余 24 条染色体信号较弱而被认为是 DD 基因组。利用图像分析系统,Shishido 等(1995)构建了 DD 基因组的染色体核型。这样,尽管目前还没有找到 D 基因组的供体植物,但其染色体却通过 GISH 技术得以确认,这为进一步研究 DD 基因组的起源和分化提供了一定的基础。

O. meyeriana、*O. granulata* 和 *O. ridleyi*、*O. longiglumis* 分别隶属于 Sect. Meyeriana 和 Sect. Ridleye, 由于稻属族间杂交困难,故一直未见通过细胞遗传学手段确立这 4 个种的基因组类型的报道。Aggarwal 等(1997)利用总 DNA 做探针的膜杂交结果,确立了前两个种的基因组类型为 G, 后两个种的基因组类型为 HJ,并认为这两个复合体是稻属中最为分化的类群,这一点与依据其它手段所得的结果以及我们通过 *trn*K 基因的 PCR-RFLP 实验的结果是一致的(张寿洲和洪德元,待发表)。但依据这一结果,不可能说明该类群具异源四倍体性质,GISH 技术的应用有助于对这一问题的澄清。

GISH 技术的另一个很重要的应用是异源染色体或染色体片段在受体(recipient species)种中的存在与否的检测,这在稻育种工作中,高效地鉴定一些新基因(这些基因对受体基因组破坏作用必须很小)的引入具有重要意义。颜辉黄(私人通信)利用这一技术,成功地鉴定了 *O. sativa* 基因组中附加的一条 *O. eichingeri* 染色体。

4　原位杂交技术在稻属研究中的应用前景

作为分子遗传学与细胞遗传学结合而产生的一门新兴技术,原位杂交具有许多上述二学科所不具备的优点,它不仅能够将核酸序列直接定位在染色体或间期核中的特定位置,以构建染色体的物理图谱,分析染色体和基因组的结构,而且能对伴随物种形成过程中的基因组内及基因组间的结构重排进行探测。在禾本科其他栽培作物中,利用 18s/5.8s/26s rDNA 、5s rDNA、种特异性和基因组特异性的重复序列在不同类群的比较定位研究已有许多报道,而且这些研究从不同的层次揭示了异源多倍体的起源、不同基因组间的关系,以及在物种分化过程中发生的一些结构变异(Jiang & Gill, 1994;Badaeva *et al*., 1996)。然而,原位杂交技术在稻属的应用由于客观方面的原因有一定的困难,这些原因直接影响分析的结果,尤其在基因定位方面,确定带有杂交信号的染色体属于哪一条也比较困难。随着细胞学制片技术的改进和荧光原位杂交技术(FISH)的应用,稻属原位杂交研究的逐渐增多,这将对于澄清稻属长期以来未能解决的如下一些细胞遗传学问题很有

帮助:

(A) 稻属各个种的染色体核型皆很相似,染色体的鉴定除了第1、第2、第3等3个大染色体以及第4号近端染色体、第11号随体染色体外,其余染色体的鉴定相对困难,利用原位杂交技术,建立一套染色体特异性分子标记,并进行不同类群的比较图谱研究,有助于从分子细胞遗传学的角度揭示稻属的物种分化程度和物种分化过程中的一些遗传变异机制。

(B) 稻属24个物种中目前已清楚基因组类型的有22种,其所包含的基因组类型有A、B、C、E、F、G、BC、CD和HJ,还有2个种(*O. schlechteri* Pilger 和 *O. neocaledonia* Morat)基因组结构不清楚。DD基因组目前仅存在于美洲的四倍体类群中,而在自然居群中还未找到二倍体DD基因组的供体。含BBCC的四倍体野生稻 *O. punctata* 和 *O. minuta* 间断分布于非洲和东南亚,但BB只局限在非洲。*O. minuta* 的B基因组从何而来?它与 *O. punctata* 是单系起源还是双系起源?含CCDD的3个四倍体中的D基因组究竟与E基因组是何关系?这些都是需要探讨的问题。Second (1985)认为D基因组与我国广西的药用野生稻 *O. officinalis* 有一定关系。根据Hu(1965)对东南亚不同居群的药用野生稻的杂交试验结果,其育性差异相当大,说明药稻本身已有了一定的分化,而且该种也发现有四倍体的居群。如果C基因组与D基因组有关系,在种间杂种的配对构型上就应该很清楚,而事实上并非如此。故此CCDD的起源仍然是个未解之谜,利用ISH和GISH并结合其它技术,则有可能澄清所有上述问题。

(C) 稻属细胞遗传学研究已经积累了丰富的资料,如稻复合体(*O. sativa* complex)中,*O. glumaepatala* 分布于美洲,*O. rufipogon* 分布于亚洲和澳大利亚北部,*O. meridionalis* 仅分布于澳大利亚北部,*O. barthii* 分布于非洲,*O. nivara* 分布于印度、越南等南亚诸国,细胞学已经证明它们属于同一个基因组,而形态上已有较大的差异,地理分布也发生了间断,但是其染色体的同源性(可配对性)仍然很高,也就是说其同源性分化程度很低。其结构如何变化尚不知,但这方面研究很有意义,可以利用种特异性和基因组特异性的重复序列甚至单拷贝基因在不同种的ISH定位比较研究来揭示。

综上所述,原位杂交在稻属的应用尽管受到一些限制,但在细胞制片技术改进的基础上,其应用已经获得了较大的发展。虽然目前在稻属的原位杂交主要集中于不同核酸序列在稻染色体上的定位,对野生稻的基因定位报道相应较少,但随着ISH技术的发展,特别是间期核伸展染色质以及减数分裂粗线期染色体的制片技术改进,ISH在稻属的应用会逐渐增多。利用种特异性和基因组特异性重复序列在不同稻属类群定位的比较研究,有可能在染色体进化的水平上获得有关该属物种分化机制的一些新的认识。GISH技术的应用则能够在基因组水平上为探讨不同基因组的结构以及基因组间关系提供分子细胞遗传学新的证据,并有可能揭示该属几个异源多倍体的亲本类型,以及确定另2个种的基因组类型。另外在稻属中有3个种 *O. punctata*、*O. officinalis* 和 *O. eichingeri* 有二倍体和四倍体两种类型,染色体配对分析证实其为异源四倍体,而其起源或者亲本类型的研究未见报道,GISH的应用则有可能解决这一问题。

参 考 文 献

Aggarwal R K, Brar D S, Khush G S,1997. Two new genomes in the *Oryza* complex identified on the basis of molecular divergence analysis using total genomic DNA hybridization. Mol Gen Genet, 254: 1～12

Badaeva E D, Friebe B, Gill B S, 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species . Genome, 39:293～306

Chung M C,Ning C N, Wu H K,1993. Localization of ribosomal RNA genes on rice chromosome. Bot Bull Acad Sin, 34: 43～55

Fukui K,1990. Localization of rRNA genes on rice chromosome. Rice Biotech Quart ,1:18～19

Fukui K, Kadowaki K, Matsuoka S, 1987. *In situ* hybridization of I-labelled rRNA to rice chromosomes. Rice Genet Newslett, 4:114～116

Fukui K, Ohmido N, Khush G S,1994. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 87:893～899

Fransz F F, Alonso-Blanco C, Liharska T B *et al.*, 1996 . High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres . The Plant Journal , 9(3):421～430

Gall J G, Pardue M L,1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules cytological preparations.Proc Natl Acad Sci USA, 63: 378～383

Gustafson J P, Dille J E, 1992. Chromosome location of *Oryza sativa* recombination linkage groups. Proc Natl Acad Sci USA, 89:8646～8650

Hu C H, Chang C C, 1965. Studies on the sterility of interacial hybrids in *Oryza officinalis*. Genetics, 52 (2):449

Iijima K, Kakeda K, Fukui K, 1991. Identification and characterization of somatic rice chromosomes by imaging methods. Theor Appl Genet, 81: 597～605

Islam-Faridi M N, Ishii T, Kumar V *et al.*, 1990. Chromosomal location of ribosomal RNA genes in rice by *in situ* hybridization . Rice Genet Newslett, 7:142～144

Kawase M, Kishinoto N, Tanaka T *et al.*, 1991. Intraspecific variation and genetic differentiation based on restriction fragment length polymorphism in Asian cultivated rice *Oryza sativa* L. In :IRRI ed. Rice Genetics Ⅱ. Manila, Philippines: International Rice Research Institute. 467～473

Kamisugi Y , Nakayama S, Nakajima R *et al.*, 1994. Physical mapping of the 5s ribosomal RNA genes on rice chromosome 11. Mol Gen Genet ,245:133～138

Kurata N,1986.Chromosome analysis of mitosis and meiosis in rice. In :IRRI ed.Rice Genetics Ⅰ. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.143～152

Mawal Y, Lagu M, Moon E *et al.*, 1995. *Bam*H Ⅰ and Hind Ⅲ repetitive DNA families in the rice genome. Genome, 38: 191～200

McCouch S R, Kochert G, Yu Z H *et al.*, 1988. Chromosome Map. Theor Appl Genet, 76:815～829

McIntyre M, Winbfory B, Houchins K *et al.*,1992. Relationships between *Oryza* species (Poaceae) based on 5s rDNA sequences. Pl Syst Evol, 183:249～262

Nayar N M, 1973. Origin and cytogenetics of rice. Adv Genet, 17:153～292

Ohmido, 1995. Rice chromosomes studies by fluorescence *in situ* hybridization with special reference to physical mapping and chromosome structure. J Fac Agr Hokkaido Univ,66:277～320

Ohmido N, Fukui K,1995. Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. Theor Appl Genet,91:212～217

Second G, 1985. Geographic origins, genetic diversity and the molecular clock hypothesis in the *Oryza*. In: Jacquard P *et al.* eds. Genetic Differentiation and Dispersal in Plant. Heidelberg,Berlin: Springer-Verlag. 42～56

Shishido R, Kinoshita T, Ohmido N *et al.*, 1995. Detection of D genome chromosomes by genomic *in situ* hybridization. The international rice genetics symposium, Abstracts, Poster 73

Song Y C, Gustafson J P, 1993. Physical mapping of the 5s rDNA gene complex in rice (*Oryza sativa*).

Theor Appl Genet, 90:113～119

Song Y C, Gustafson J P, 1993. Physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa*). Theor Appl Genet, 90: 113～119

Suzuki H, Futsuhara Y, Takaiwa F *et al.*, 1991. Localization of glutelin gene in rice chromosome by *in situ* hybridization. Jap J Genet, 66: 305～312

Tanksley S D, Fulton T M, McCouch S R, 1992. Linkage map of rice (*Oryza sativa* L) (2N=24). In : O'Brien S J ed. Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes (6th) Book 6. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press. 61～79

Wang Z X, Kurata N, Sajis S *et al.*, 1995. A chromosome 5-specific repetitive DNA sequence in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet, 90:807～913

Wang Z Y, Second G, Tanksley S D, 1993. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs . Theor Appl Genet, 83:565～581

Wu H K, Chung M C, Xie Y *et al.*, 1986. Chromosomal localization of rice *rbc*S gene. Rice Genet Newsletl, 3:117～119

Wu H K, Chung M C, Wu T *et al.*, 1991. Localization of specific repetitive DNA sequences in individual rice chromosomes. Chromosoma, 100: 330～338

Wu K S, Tanksley S D, 1993. Genetic and physical mapping of telomeres and macrosatellites of rice. Plant Mol Biol, 22:861～872

Zhang S Z, Hong D Y, Hizume M *et al.*, 1997. Variation in rDNA loci in the genus *Oryza* detected by *in situ* hybridization. Inter Rice Genet Newslett(in press)